

09/1636, 09/1634, 289
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



#3

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, 15/54, 9/10, 5/10, C08B 30/00, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/26362 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Juli 1997 (24.07.97)
--	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00158
(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Januar 1997 (15.01.97)
(30) Prioritätsdaten:
196 01 365.8 16. Januar 1996 (16.01.96) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-
TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Forschung &
Entwicklung, Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE).
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSSMANN, Jens
[DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE).
FROHBERG, Claus [DE/DE]; Blankenhainer Strasse 17,
D-12249 Berlin (DE).
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, KR, US, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES FROM PLANTS CODING ENZYMES WHICH PARTICIPATE IN THE STARCH
SYNTHESIS

(54) Bezeichnung: NUCLEINSÄUREMOLEKÜLE AUS PFLANZEN CODIEREND ENZYME, DIE AN DER STÄRKESYNTHESE
BETEILIGT SIND

(57) Abstract

Nucleic acid molecules are described which code enzymes which take part in the starch synthesis in plants. The enzymes represent a new isoform of the starch synthase. In addition, this invention concerns vectors and host cells which were transformed with the nucleic acid molecules described, especially transformed plant cells and regeneratable plants therefrom, which an increased or restricted activity of the proteins described.

(57) Zusammenfassung

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um eine neue Isoform der Stärkesynthase. Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformiert wurden, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der beschriebenen Proteine aufweisen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Annenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Nucleinsäuremoleküle aus Pflanzen codierend Enzyme, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym codieren, das an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine neue Isoform der Stärkesynthase.

Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Bakterien, sowie mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen.

Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von DNA-Molekülen, die eine Stärkesynthase codieren, eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Mais eine der interessantesten Pflanzen, da sie die weltweit für die Stärkeproduktion wichtigste Kulturpflanze ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucose-

ketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25 % aus Amylose-Stärke und zu ca. 75 % aus Amylopektin-Stärke.

Um eine möglichst breite Anwendung von Stärke zu ermöglichen, erscheint es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärke zu synthetisieren, die sich für verschiedene Verwendungszwecke besonders eignet. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht - neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese und/oder -modifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, diese Enzyme codierende DNA-Moleküle.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkepeichernden Geweben die Amyloplasten.

Die wichtigsten an der Stärkesynthese beteiligten Enzyme sind die Stärkesynthasen sowie die Verzweigungsenzyme. Bei den Stärkesynthasen sind verschiedene Isoformen beschrieben, die alle eine Polymerisierungsreaktion durch Übertragung eines Glucosylrestes von ADP-Glucose auf α -1,4-Glucane katalysieren. Verzweigungsenzyme katalysieren die Einführung von α -1,6-Verzweigungen in lineare α -1,4-Glucane.

Stärkesynthasen können in zwei Klassen eingeteilt werden: die Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen ("granule-bound starch

synthases"; GBSS) und die löslichen Stärkesynthasen ("soluble starch synthases"; SSS). Diese Unterscheidung ist nicht in jedem Fall eindeutig zu treffen, da einige der Stärkesynthasen sowohl stärkekorngelbunden als auch in löslicher Form vorliegen (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191-198; Mu et al., Plant J. 6 (1994), 151-159). Für verschiedene Pflanzenspezies werden innerhalb dieser Klassen wiederum verschiedene Isoformen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Startermolekülen unterscheiden (sogenannte "primer dependent" (Typ II) und "primer independent" (Typ I) starch synthases).

Lediglich für die Isoform GBSS I gelang es bisher, die genaue Funktion bei der Stärkesynthese zu ermitteln. Pflanzen, in denen diese Enzymaktivität stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine amylosefreie (sogenannte "waxy") Stärke (Shure et al., Cell 35 (1983), 225-233; Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296; WO 92/11376), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylose-Stärke zugesprochen wird. Dieses Phänomen wird ebenfalls in Zellen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet (Delrue et al., J. Bacteriol. 174 (1992), 3612-3620). Bei *Chlamydomonas* konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß GBSS I nicht nur an der Synthese der Amylose beteiligt ist, sondern auch einen Einfluß auf die Amylopektinsynthese besitzt. In Mutanten, die keine GBSS I-Aktivität aufweisen, fehlt eine bestimmte Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopektins, die längerkettige Glucane aufweist.

Die Funktionen der anderen Isoformen der Stärkekorngelbundenen Stärkesynthasen, insbesondere der GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bisher unklar. Es wird angenommen, daß die löslichen Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen an der Synthese des Amylopektins beteiligt sind (siehe z.B. Ponstein et al., Plant Physiol. 92 (1990), 234-241) und daß sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Stärkesyntheserate spielen.

Bei Mais wurden zwei Isoformen der Stärkekorngelbundenen, sowie zwei bzw. drei Isoformen der löslichen Stärkesynthasen identifiziert (Hawker et al., Arch. Biochem. Biophys. 160 (1974), 530-551; Pollock und Preiss, Arch. Biochem. Biophys.

204 (1980), 578-588; MacDonald und Preiss, *Plant Physiol.* 78 (1985), 849-852; Mu et al., *Plant J.* 6 (1994), 151-159).

Eine GBSS I aus Mais codierende cDNA sowie eine genomische DNA sind bereits beschrieben (Shure et al., *Cell* 35 (1983), 225-233; Kloesgen et al., *Mol. Gen. Genet.* 203 (1986), 237-244). Weiterhin ist ein sogenannter "Expressed Sequence Tag" (EST) beschrieben worden (Shen et al., 1994, GenBank Nr.: T14684), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine starke Ähnlichkeit zur abgeleiteten Aminosäuresequenz der GBSS II aus Erbse (Dry et al., *Plant J.* 2 (1992), 193-202) und Kartoffel (Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283-294) aufweist. Nucleinsäuresequenzen, die weitere Stärkesynthase-Isoformen aus Mais codieren, lagen jedoch bisher noch nicht vor. cDNA-Sequenzen, die für andere Stärkesynthasen als für die GBSS I codieren, wurden bisher lediglich für Erbse (Dry et al., *Plant J.* 2 (1992), 193-202), Reis (Baba et al., *Plant Physiol.* 103 (1993), 565-573) und Kartoffel (Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283-294) beschrieben.

Außer beim Mais wurden lösliche Stärkesynthasen auch in einer Reihe weiterer Pflanzenarten identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen sind beispielsweise bis zur Homogenität aus Erbse (Denyer und Smith, *Planta* 186 (1992), 609-617) und Kartoffel (Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283-294) isoliert worden. In diesen Fällen stellte sich heraus, daß die als SSS II identifizierte Isoform der löslichen Stärkesynthase identisch ist mit der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., *Plant J.* 4 (1993), 191-198; Edwards et al., *Plant J.* 8 (1995), 283-294). Für einige weitere Pflanzenspezies wurde das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen mit Hilfe chromatographischer Methoden beschrieben, beispielsweise bei Gerste (Tyynelä und Schulman, *Physiologia Plantarum* 89 (1993) 835-841; Kreis, *Planta* 148 (1980), 412-416) und Weizen (Rijven, *Plant Physiol.* 81 (1986), 448-453). DNA-Sequenzen, die diese Proteine codieren, wurden jedoch bisher nicht beschrieben.

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils

DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen der Stärkesynthasen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch veränderte Pflanzen herzustellen, die eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität dieser Enzyme aufweisen, wodurch es zu einer Veränderung der chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften der in diesen Pflanzen synthetisierten Stärke kommt.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase codieren, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon enthalten, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region umfassen bzw. entsprechende Ribonucleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine Stärkesynthase codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die eine Stärkesynthase codieren und die mit einem der oben beschriebenen Moleküle hybridisieren.

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz auf weisen, die zu der gesamten oder einem Teil der Sequenz der obengenannten Nucleinsäuremoleküle komplementär ist.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA- als auch RNA-Moleküle handeln. Entsprechende DNA-Moleküle sind beispielsweise genomische oder cDNA-Moleküle. RNA-Moleküle können beispielsweise mRNA oder antisense-RNA-Moleküle sein.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jedem beliebigen Organismus (d.h. Prokaryonten oder Eukaryonten, insbesondere aus Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen oder tierischen Organismen) stammen, der derartige Moleküle besitzt. Sie stammen vorzugsweise aus monokotylen oder dikotylen Pflanzen, insbesondere aus Nutzpflanzen, und besonders bevorzugt aus stärke-speichernden Pflanzen, insbesondere aus Mais.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Organismen isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle aus Pflanzen oder anderen Organismen kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene

identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Wichtige Charakteristika einer Stärkesynthase sind: i) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese linearer α -1,4-verknüpfter Polyglucane unter Verwendung von ADP-Glucose als Substrat. Diese Aktivität kann wie in Denyer und Smith (Planta 186 (1992), 606-617) oder wie in den Beispielen beschrieben bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell aus jedem Organismus stammen, der die beschriebenen Proteine exprimiert, vorzugsweise aus Pflanzen, insbesondere aus stärkesynthetisierenden bzw. stärkespeichernden Pflanzen. Diese können sowohl monokotyle oder auch dikotyle Pflanzen sein. Besonders bevorzugt sind dabei z.B. Getreidearten (wie Gerste, Roggen, Hafer, Weizen etc.), Mais, Reis, Erbse, Maniok, Kartoffel usw.

Bei den durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierten Proteine handelt es sich um eine bisher nicht identifizierte und charakterisierte Isoform einer pflanzlichen Stärkesynthase. Diese Proteine weisen die enzymatische Aktivität einer Stärkesynthase auf, sowie auch gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten Stärkesynthasen aus Pflanzen, können aber keiner der bisher bekannten Isoformen eindeutig zugeordnet werden.

Die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen insbesondere die Eigenschaft auf, daß sie nach Einführung in eine E. coli-Mutante, bei der sämtliche glg-Gene deletiert sind und die eine mutierte, deregulierte ADP-Glucose-Pyrophosphorylase exprimiert, Kultivierung dieser

Mutante auf Glucose-haltigem Medium und Jodbedampfung zur Blaufärbung der Bakterienkolonien führt.

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Diese Oligonucleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Stärkesynthasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist insofern interessant, als daß auf diese Weise eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion,

die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen, wie z.B. Mutanten, die als Substrat ADP-Glucose-6-Phosphat anstatt ADP-Glucose verwenden. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Muta-

genese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert und genetisch modifiziert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um bakterielle Zellen oder pflanzliche Zellen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner die Proteine oder biologisch aktive Fragmente davon, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, wobei eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und anschließend das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen, wie es

bisher nicht möglich war, und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nucleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Die wirtschaftliche Bedeutung der Möglichkeit des Eingriffs in die Stärkesynthese allein bei Mais ist offensichtlich: Mais ist weltweit die wichtigste Pflanze zur Stärkegewinnung. Ca. 80% der weltweit jährlich produzierten Stärke wird aus Mais gewonnen.

Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Stärkesynthese zu erhöhen. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäß Stärkesynthasen zu erhalten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperaturabhängigkeiten oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen

sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül transformiert und genetisch modifiziert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Die transgenen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen lassen sich von natürlicherweise auftretenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie integriert in ihr Genom ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül enthalten, welches in den Zellen natürlicherweise entweder überhaupt nicht vorhanden ist, oder aber in einer anderen genetischen Umgebung, d.h. an einem anderen Ort im Genom. Pflanzenzellen, die gegebenenfalls natürlicherweise in ihrem Genom ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül enthalten, unterscheiden sich von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dadurch, daß letztere mehr Genkopien der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle aufweisen, als natürlicherweise in den jeweiligen natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen auftreten und daß diese zusätzlichen Kopien an anderen genetischen Loci integriert sind. Die oben erwähnten Merkmale lassen sich beispielsweise durch Southern Blot-Analyse genomischer DNA bestimmen.

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die obenbeschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl

monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere um Stärkesynthetisierende bzw. Stärkespeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste Hafer, Weizen etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok oder Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge etc.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression bzw. zusätzlichen Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu Wildtypstärke verändert sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die aus den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Pflanzenzellen, in denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen.

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden anti-

sense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressions-effektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der erfindungsgemäßen Proteine codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle.

Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins in pflanzlichen Zellen eine antisense-RNA exprimiert.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind. Bevorzugt werden DNA-Moleküle verwendet, die homolog in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Die erfindungsgemäßen Zellen lassen sich daher von natürlicherweise vorkommenden Zellen dadurch unterscheiden, daß sie ein heterologes rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das eine antisense-RNA, ein Ribozym oder eine Cosuppressions-RNA codiert. Aufgrund der Expression dieses heterologen rekombinanten DNA-Moleküls kommt es zur Verringerung der Synthese eines erfindungsgemäßen Proteins in den Zellen und somit zur Verringerung der entsprechenden Aktivität.

"Heterologe" DNA bedeutet in diesem Zusammenhang, daß es sich bei der in die Zellen eingeführten DNA um eine DNA handelt,

die in dieser Form natürlicherweise nicht in den Zellen vorkommt. Es kann sich dabei zum einen um DNA handeln, die natürlicherweise in diesen transformierten Zellen gar nicht vorkommt oder auch um DNA, die, selbst wenn sie natürlicherweise in diesen Zellen vorkommt, als exogene DNA in andere genetische Loci integriert ist und sich somit in einer anderen genetischen Umgebung befindet.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Gegenstand der Erfindung sind somit auch Pflanzen, die die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei diesen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Vorzugsweise handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. um Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für die menschliche oder tierische Ernährung oder für technische Zwecke. Insbesondere sind es vorzugsweise stärke-synthetisierende bzw. stärke-speichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, etc.), Reis, Mais, Erbse, Maniok oder Kartoffel. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, wie z.B. Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge etc.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Verringerung der Aktivität eines der erfindungsgemäßen Proteine eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Diese Stärke kann beispielsweise veränderte Viskositäten und/oder Gelbildungseigenschaften ihrer Kleister zeigen im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Gegenstand der Erfindung ist somit auch die aus den vorgehend beschriebenen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältliche Stärke.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittel-bereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität,

die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

2.1. Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2. Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton

werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tabletten-sprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicyl-

säure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Ausse-

hens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygrup-

pen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/ Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -

transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern
Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,
O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige
Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu

zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die eine neue in Mais identifizierte Isoform einer Stärkesynthase codierenden. Dies erlaubt nun sowohl die Identifizierung der Funktion dieser Isoform bei der Stärkebiosynthese, als auch die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist. Dies ermöglicht die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und somit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in derartig manipulierten Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen

die Aktivität der erfindungsgemäßen Stärkesynthase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Dabei sind alle Kombinationen und Permutationen denkbar. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer Isoformen der Stärkesynthasen in den Zellen der stärke-speichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z.B. in dem Endosperm von Mais oder Weizen oder in der Knolle bei der Kartoffel kann es darüber hinaus zu einer Ertragssteigerung kommen. Beispielsweise können Nucleinsäuremoleküle, die für ein erfindungsgemäßes Protein codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener GBSS I-, SSS- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzyms inhibiert ist (wie z.B. beschrieben in WO92/14827 oder der ae-Mutante (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86)).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer Stärke-Synthasen in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Stärkesynthasen codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte.

Weiterhin ist die Konstruktion von DNA-Molekülen möglich, bei denen neben DNA-Sequenzen, die Stärkesynthasen codieren, weitere DNA-Sequenzen, die andere Proteine, die an der Stärkesynthese oder -modifikation beteiligt sind, in antisense-Orientierung an einen geeigneten Promotor gekoppelt sind. Die Se-

quenzen können hierbei wiederum hintereinandergeschaltet sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise von 5 kb nicht überschreiten.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorngelbungs- (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme, "Debranching"-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in klassische Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorngelbungs- (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Ver-

= 351

fügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten

der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren,

wie z.B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donorzellen und von den Kultivierungsbedingungen.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Verwendete Abkürzungen

bp Basenpaar

GBSS granule bound starch synthase (Stärke Korn-gebundene Stärkesynthase)

IPTG Isopropyl β -D-Thiogalacto-Pyranosid

SS starch synthase (Stärkesynthase)

SSS soluble starch synthase (lösliche Stärkesynthase)

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

20 x SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g Natrium-Citrat
	ad 1000 ml mit ddH ₂ O
	pH 7,0 mit 10 N NaOH
YT	8 g Bacto-Yeast extract
	5 g Bacto-Tryptone
	5 g NaCl
	ad 1000 ml mit ddH ₂ O

Protoplastenisolierungsmedium (100 ml)

Cellulase Onozuka R S (Meiji Seika, Japan)	800 mg
Pectolyase Y 23	40 mg
KNO ₃	200 mg
KH ₂ PO ₄	136 mg
K ₂ HPO ₄	47 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	147 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	250 mg
Bovine serum albumin (BSA)	20 mg
Glucose	4000 mg
Fructose	4000 mg
Saccharose	1000 mg
pH	5,8
Osmolarität	660 mosm.

Protoplastenwaschlösung 1: wie Protoplastenisolierlösung, aber ohne Cellulase, Pectolyase und BSA

Transformationspuffer

a) Glucose	0,5 M
MES	0,1 %
MgCl ₂ 6H ₂ O	25 mM
pH	5,8
auf 600 mosm. einstellen	

b) PEG 6000-Lösung

Glucose	0,5 M
MgCl ₂ 6H ₂ O	100 mM
Hepes	20 mM
pH	6,5

Dem obigen Puffer unter b) wird PEG 6000 kurz vor Gebrauch der Lösung zugesetzt (40 Gew.-% PEG). Die Lösung wird durch ein 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

W5 Lösung

CaCl ₂	125 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Glucose	50 mM

Protoplasten-Kulturmedium (Angaben in mg/l)

KNO ₃	3000
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
MgSO ₄ 7H ₂ O	350
KH ₂ PO ₄	400
CaCl ₂ 2H ₂ O	300

Fe-EDTA und Spurenelemente wie im Murashige-Skoog-Medium (Physiol. Plant, 15 (1962), 473).

m-Inosit	100
Thiamin HCl	1,0
Nicotinsäureamid	0,5
Pyridoxin HCl	0,5
Glycin	2,0
Glucuronsäure	750
Galacturonsäure	750
Galactose	500
Maltose	500
Glucose	36.000

Fructose	36.000
Saccharose	30.000
Asparagin	500
Glutamin	100
Prolin	300
Caseinhydrolysat	500
2, 4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	0,5
pH	5,8
Osmolarität	600 mosm.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die pUSP-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

3. Transformation von Mais

(a) Herstellung von Protoplasten der Zelllinie DSM 6009

Protoplastenisolierung

2 - 4 Tage, vorzugsweise 3 Tage nach dem letzten Mediumswechsel einer Protoplastensuspensionskultur wird das Flüssigmedium abgesaugt und die zurückbleibenden Zellen mit 50 ml Protoplastenwaschlösung 1 gespült und nochmals trockengesaugt. Zu jeweils 2 g der geernteten Zellmasse wird 10 ml Protoplastenisolierungsmedium gegeben. Die resuspendierten Zellen und Zellaggregate werden bei $27 \pm 2^\circ \text{C}$ unter leichtem Schütteln (30 bis 40 rpm) 4 bis 6 h im Dunkeln inkubiert.

Protoplastenreinigung

Sobald die Freisetzung von mindestens 1 Mio. Protoplasten/ml erfolgt ist (mikroskopische Beobachtung), wird die Suspension durch ein Edelstahl- und Nylonsieb von 200 bzw. 45 μm Maschenwerte gesiebt. Die Kombination eines 100 μm und eines 60 μm Siebs ermöglicht die Abtrennung der Zellaggregate genauso gut. Das protoplastenhaltige Filtrat wird mikroskopisch beurteilt. Üblicherweise enthält es 98 - 99 % Protoplasten. Der Rest sind unverdaute Einzelzellen. Protoplastenpräparationen mit diesem Reinheitsgrad werden ohne zusätzliche Gradientenzentrifugation für Transformationsexperimente verwendet. Durch Zentrifugation (100 UpM im Aufschwingrotor (100 x g, 3 min) werden die Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Protoplasten in Waschlösung 1 resuspendiert. Die Zentrifugation wird wiederholt und die Protoplasten danach im Transformationspuffer resuspendiert.

(b) Protoplastentransformation

Die in Transformationspuffer resuspendierten Protoplasten werden bei einem Titer von $0,5 - 1 \times 10^6$ Protoplasten/ml in 10 ml Portionen in 50 ml Polyallomer-Röhrchen eingefüllt. Die zur Transformation verwendete DNA wird in Tris-EDTA (TE) Puffer gelöst. Pro ml Protoplastensuspension werden 20 μg Plasmid-DNA zugegeben. Als Vektor wird dabei ein Phosphinotricinresistenz vermittelndes Plasmid verwendet (vgl. z.B. EP 0 513 849). Nach der DNA-Zugabe wird die Protoplastensuspension vorsichtig geschüttelt, um die DNA homogen in der Lösung zu verteilen. Sofort danach wird tropfenweise 5 ml PEG-Lösung zugetropft.

Durch vorsichtiges Schwenken der Röhrchen wird die PEG-Lösung homogen verteilt. Danach werden nochmals 5 ml PEG-Lösung zugegeben und das homogene Durchmischen

wiederholt. Die Protoplasten verbleiben 20 min der PEG-Lösung bei $\pm 2^{\circ} \text{C}$. Danach werden die Protoplasten durch 3-minütiges Zentrifugieren (100 g; 1000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Die Protoplasten werden durch vorsichtiges Schütteln in 20 ml W5-Lösung gewaschen und danach erneut zentrifugiert. Danach werden sie in 20 ml Protoplastenkulturmedium resuspendiert, nochmals zentrifugiert und erneut in Kulturmedium resuspendiert. Der Titer wird auf $6 - 8 \times 10^5$ Protoplasten/ml eingestellt und die Protoplasten in 3 ml Portionen in Petrischalen (\varnothing 60 mm, Höhe 15 mm) kultiviert. Die mit Parafilm versiegelten Petrischalen werden bei $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ im Dunkeln aufgestellt.

(c) Protoplastenkultur

Während der ersten 2 - 3 Wochen nach der Protoplastenisolierung und -transformation werden die Protoplasten ohne Zugabe von frischem Medium kultiviert. Sobald sich die aus den Protoplasten regenerierten Zellen zu Zellaggregaten mit mehr als 20 - 50 Zellen entwickelt haben, wird 1 ml frisches Protoplastenkulturmedium zugegeben, das als Osmoticum Saccharose (90 g/l) enthält.

(d) Selektion transformierter Maiszellen und Pflanzenregeneration

3 - 10 Tage nach der Zugabe von frischem Medium können die aus Protoplasten entstandenen Zellaggregate auf Agar-Medien mit 100 mg/l L-Phosphinothricin plattiert werden. N6-Medium mit den Vitaminen des Protoplastenkulturmediums, 90 g/l Saccharose und 1,0 mg/l 2,4D ist ebenso geeignet wie ein analoges Medium beispielsweise mit den Makro- und Mikronährsalzen des MS-Mediums (Murashige und Skoog (1962), siehe oben).

Auf dem Selektivmedium können die aus stabil transformierten Protoplasten hervorgegangenen Kalli ungehin-

dert weiterwachsen. Nach 3 - 5 Wochen, vorzugsweise 4 Wochen können die transgenen Kalli auf frisches Selektionsmedium transferiert werden, welches ebenfalls 100 mg/l L-Phosphinothricin enthält, das aber kein Auxin mehr enthält. Innerhalb von 3 - 5 Wochen differenzieren ca. 50 % der transgenen Maiskalli, die das L-Phosphinothricinacetyltransferase-Gen in ihr Genom integriert haben, auf diesem Medium in Gegenwart von L-Phosphinothricin erste Pflanzen.

(e) Aufzucht transgener Regeneratpflanzen

Das embryogene transformierte Maisgewebe wird auf hormonfreiem N6-Medium (Chu C.C. et al., Sci. Sin. 16 (1975), 659) in Gegenwart von 5×10^{-4} M L-Phosphinothricin kultiviert. Auf diesem Medium entwickeln sich Maisembryonen, die das Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (PAT-Gen) hinreichend stark exprimieren, zu Pflanzen. Nicht transformierte Embryonen oder solche mit nur sehr schwacher PAT-Aktivität sterben ab. Sobald die Blätter der in vitro-Pflanzen eine Länge von 4 - 6 mm erreicht haben, können diese in Erde transferiert werden. Nach Abwaschen von Agarresten an den Wurzeln werden die Pflanzen in ein Gemisch von Lehm, Sand, Vermiculit und Einheitserde im Verhältnis 3:1:1:1 gepflanzt und während der ersten 3 Tage nach dem Verpflanzen bei 90 - 100 % relativer Luftfeuchte an die Erdkultur adaptiert. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer mit 14 h Lichtperiode ca. 25000 Lux in Pflanzenhöhe bei einer Tag/Nachttemperatur von $23 \pm 1/17 \pm 1^\circ \text{C}$. Die adaptierten Pflanzen werden bei einer Luftfeuchte von 65 ± 5 % kultiviert.

4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Beispiel 1

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine neue Isoform einer Stärkesynthase aus *Zea mays* codiert

Zur Identifizierung einer cDNA, die eine neue Stärkesynthase aus Mais codiert, wurde die Strategie der funktionellen Expression in einer geeigneten *E. coli*-Mutante gewählt. *E. coli* synthetisiert auf bestimmten Nährmedien (Vollmedium mit 1% Glucose) als Speicherkohlenhydrat Glycogen, ein Polysaccharid, das dem Amylopektin in seiner Struktur ähnlich ist, jedoch stärker verzweigt ist (7-10% Verzweigungspunkte gegenüber 4-5%) und normalerweise ein höheres Molekulargewicht aufweist. Der höhere Verzweigungsgrad bedingt auch eine unterschiedliche Färbung mit Jod. Glycogen wird mit Jod bräunlich, Amylopectin lila und Amylose blau angefärbt.

In *E. coli* sind essentiell drei Gene für die Glycogensynthese verantwortlich, *glgA*, *glgB* und *glgC*, die Glycogensynthase, das Verzweigungsenzym und die ADP-glucosepyrophosphorylase codieren. Dieses System ist analog dem der Stärkebiosynthese in Pflanzen. Wird eine pflanzliche Stärkesynthase in Wildtyp *E. coli*-Zellen exprimiert, so ist der Einfluß des Enzyms auf die Eigenschaften des Glycogens mittels Jodfärbung nur sehr schwer oder gar nicht zu detektieren, da die von der Stärkesynthase produzierten Glucane von dem Verzweigungsenzym genauso verzweigt werden, wie die von der Glycogensynthase produzierten Glucane.

Deshalb wurde ein *E. coli*-Stamm erstellt, der ein einfaches Screening nach der funktionellen Expression einer Stärkesynthase mittels Jodfärbung erlaubt. Hierfür wurde die Mutante

HfrG6MD2 (Schwartz, J. Bacteriol. 92 (1966), 1083-1089), in der sämtliche glg-Gene deletiert sind, transformiert mit dem Plasmid pACAC. Dieses Plasmid enthält ein DNA-Fragment, das die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus *E. coli* codiert, unter der Kontrolle des lac Z-Promotors. Das Fragment war als ca. 1,7 kb großes DraI/HaeII-Fragment aus dem Vektor pEca-15 (siehe B. Müller-Röber (1992), Dissertation, FU Berlin) isoliert worden und nach Glättung der Enden in einen mit HindIII linearisierten pACYC184-Vektor cloniert worden. Dieses Plasmid vermittelt die Expression einer mutierten, deregulierten ADP-Glucose-Pyrophosphorylase aus dem *E. coli*-Stamm LCB 618, der größere Mengen an Glycogen, aufgrund der Mutation dieses Enzyms, akkumuliert (Preiss und Romeo in *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, London, Vol. 30, 183-238). Dies gewährleistet die Bereitstellung ausreichender Mengen von ADP-Glucose, dem Substrat der Stärkesynthasen, und soll bei gleichzeitiger funktioneller Expression von Stärkesynthasen die Synthese von mit Jod blau anfärbbaren linearen α -1,4-Glucanen in *E. coli* HfrG6MD2 gewährleisten. Weiterhin ist das Plasmid pACAC als Derivat des Vektors pACYC184 mit Plasmiden wie pBluescript SK (-) kompatibel.

Dieser Stamm wurde mit einer cDNA-Bibliothek transformiert, die in dem Vektor pBluescript SK (-) enthalten war und aus RNA aus Blättern von *Zea mays*, Linie B73, hergestellt worden war. Diese wurde erstellt indem ca. 10^6 Phagen einer cDNA-Bibliothek aus RNA aus Blättern von *Zea mays*, Linie B73, enthalten in dem Vektor Uni-ZAPTMXR (Stratagene GmbH, Heidelberg), mittels in vivo excision zunächst in Phagmide überführt wurden. *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden mit diesen Phagmiden infiziert und 3×10^5 Transformanten wurden auf festem, selektivem (enthaltend Ampicillin) Nährmedium plattiert. Nach Wachstum wurden die Zellen abgeschwemmt und aus diesen Plasmid-DNA präpariert. Der Transfer der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580). Ca. 4×10^5 transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf Agarkulturmedien mit folgender Zusammensetzung ausgestrichen:

YT-Medium mit:

1,5% Bacto-Agar

1 % Glucose

10 mg/l Chloramphenicol

50 mg/l Ampicillin

1 mM IPTG

2 mM Diaminopimelinsäure

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Zellen mit Jod bedampft. Eine blaufärbende Kolonie wurde erhalten. Aus dieser wurde Plasmid-DNA isoliert und diese zur nochmaligen Transformation eingesetzt. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Replikaplaten ausgestrichen. Eine der Replikaplaten wurde wiederum angefärbt. Blaufärbende Clone wurden zur Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA angezogen.

Nach Überprüfung der Größe des cDNA-Fragments wurde der Clon pSSZm weiter analysiert.

Beispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSSZm

Aus einem entsprechend Beispiel 1 erhaltenen E. coli-Clon wurde das Plasmid pSSZm isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxynucleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 2651 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben. Die korrespondierende Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 2 dargestellt.

Eine Sequenzanalyse und ein Sequenzvergleich mit bekannten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine partielle codierende Region umfaßt, die gewisse Homologien zu Stärkesynthasen aus verschiedenen Organismen aufweist. Weiterhin stellt das codierte Protein eine neue Isoform von Stärkesynthasen dar, daß sich den bisher beschriebenen Klassen nicht eindeutig zuordnen läßt. Das durch diese cDNA-Insertion oder durch hybridisierende Sequenzen co-

dierte Protein wird im Rahmen dieser Anmeldung als SSZm bezeichnet. Mit Hilfe dieser partiellen cDNA-Sequenz ist es für eine in der Molekularbiologie erfahrene Person ohne weiteres möglich, die gesamte codierende Region enthaltende Vollängen-clone zu isolieren und seine Sequenz zu bestimmen. Dazu wird z.B. eine blattspezifische cDNA-Expressionsbank aus *Zea mays*, Linie B73 (Stratagene GmbH, Heidelberg), nach Standardverfahren mittels Hybridisierung mit einem 5'-Fragment der cDNA-Insertion des Plasmids pSSZM (200 bp) auf Vollängen-Clone hin durchgemustert. So erhaltene Clone werden sodann sequenziert. Eine andere Möglichkeit zum Erhalt der noch fehlenden 5'-terminal gelegenen Sequenzen besteht in der Anwendung der 5'-Race Methode (Stratagene o.vgl. Hersteller).

42
SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Jens Kosmann
- (B) STRASSE: Golmer Fichten 9
- (C) ORT: Golm
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 14476

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsaeuremolekuele aus Pflanzen codierend Enzyme, die an der Staerkesynthese beteiligt sind

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2652 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Zea mays
- (B) STAMM: B73
- (F) GEWEBETYP: Blattgewebe

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: cDNA-Bibliothek in pBluescriptSK-
- (B) CLON(E): pSSZm

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 9..2213

(xi). SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCGG CAC GAG AAT TTT CTA AAA GGA AAG CTT ATT GAG ATA ACT GAG His Glu Asn Phe Leu Lys Gly Lys Leu Ile Glu Ile Thr Glu 1 5 10	50
ACA GAG GAG AGT CTA TTC AAG TTG GAG AAA GAG TGT GCT CTT CTA AAT Thr Glu Glu Ser Leu Phe Lys Leu Glu Lys Glu Cys Ala Leu Leu Asn 15 20 25 30	98
GCT TCC CTT AGG GAG CTC GAG TGT ACA TCC ACT TCT GCC CAA TCT GAT Ala Ser Leu Arg Glu Leu Glu Cys Thr Ser Thr Ser Ala Gln Ser Asp 35 40 45	146
GTG TTG AAA CTT GGC CCT CTG CAA CAA GAT GCC TGG TGG GAG AAA GTA Val Leu Lys Leu Gly Pro Leu Gln Gln Asp Ala Trp Trp Glu Lys Val 50 55 60	194
GAA AAT TTG GAA GAC TTG CTT GAT TCC ACA GCA AAC CAA GTG GAG CAT Glu Asn Leu Glu Asp Leu Leu Asp Ser Thr Ala Asn Gln Val Glu His 65 70 75	242
GCT TCT TTG ACG CTA GAT GGT TAC CGT GAT TTC CAG GAT AAG GTT GAC Ala Ser Leu Thr Leu Asp Gly Tyr Arg Asp Phe Gln Asp Lys Val Asp 80 85 90	290
AAA CTA AAA GCA TCA TTG GGA ACA ACA AAC GTA TCA GAG TTC TGT CTT Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gly Thr Thr Asn Val Ser Glu Phe Cys Leu 95 100 105 110	338
TAT TTG GTT GAT ATT TTG CAG CAA AGG GTA AAA TCA GTA GAA GAG CGC Tyr Leu Val Asp Ile Leu Gln Gln Arg Val Lys Ser Val Glu Glu Arg 115 120 125	386
TTT CAA GCA TGT AAT CAT GAA ATG CAT TCA CAA ATT GAA CTT TAT GAA Phe Gln Ala Cys Asn His Glu Met His Ser Gln Ile Glu Leu Tyr Glu 130 135 140	434
CAC TCA ATA GTG GAG TTT CAT GGT ACT CTC AGC AAA CTA ATA AAT GAA His Ser Ile Val Glu Phe His Gly Thr Leu Ser Lys Leu Ile Asn Glu 145 150 155	482
AGT GAG AAA AAG TCA ATG GAG CAT TAT GCA GAA GGC ATG CCA TCA GAG Ser Glu Lys Lys Ser Met Glu His Tyr Ala Glu Gly Met Pro Ser Glu 160 165 170	530
TTC TGG AGT AGG ATC TCT CTT CTG ATT GAT GGG TGG TCG CTT GAG AAG Phe Trp Ser Arg Ile Ser Leu Leu Ile Asp Gly Trp Ser Leu Glu Lys 175 180 185 190	578
AAA ATA TCC ATT AAT GAT GCA AGT ATG TTG AGA GAA ATG GCT TGG AAA Lys Ile Ser Ile Asn Asp Ala Ser Met Leu Arg Glu Met Ala Trp Lys 195 200 205	626
AGG GAT AAT CGC CTC CGG GAA GCT TAC TTG TCA TCC AGA GGA ATG GAA Arg Asp Asn Arg Leu Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Met Glu 210 215 220	674

GAG AGG GAA CTG ATA GAT AGT TTT CTA AAG ATG GCA CTA CCA GGA ACA Glu Arg Glu Leu Ile Asp Ser Phe Leu Lys Met Ala Leu Pro Gly Thr 225 230 235	722
AGT TCT GGT TTG CAC ATT GTC CAC ATA GCA GCA GAG ATG GCT CCT GTC Ser Ser Gly Leu His Ile Val His Ile Ala Ala Glu Met Ala Pro Val 240 245 250	770
GCA AAG GTT GGT GGT CTG GCA GAT GTG ATC TCT GGT CTT GGG AAG GCA Ala Lys Val Gly Gly Leu Ala Asp Val Ile Ser Gly Leu Gly Lys Ala 255 260 265 270	818
CTT CAA AAA AAG GGG CAC CTT GTA GAG ATT ATT CTT CCC AAA TAT GAT Leu Gln Lys Lys Gly His Leu Val Glu Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp 275 280 285	866
TGC ATG CAG CAT AAC CAA ATA AAT AAT CTT AAG GTT CTA GAT GTT GTG Cys Met Gln His Asn Gln Ile Asn Asn Leu Lys Val Leu Asp Val Val 290 295 300	914
GTG AAG TCT TAC TTT GAA GGA AAT ATG TTT GCC AAC AAG ATA TGG ACT Val Lys Ser Tyr Phe Glu Gly Asn Met Phe Ala Asn Lys Ile Trp Thr 305 310 315	962
GGA ACT GTT GAA GGT CTT CCG GTC TAC TTT ATT GAA CCG CAA CAT CCA Gly Thr Val Glu Gly Leu Pro Val Tyr Phe Ile Glu Pro Gln His Pro 320 325 330	1010
GGT AAG TTC TTC TGG AGG GCA CAA TAC TAC GGA GAG CAT GAT GAC TTC Gly Lys Phe Phe Trp Arg Ala Gln Tyr Tyr Gly Glu His Asp Asp Phe 335 340 345 350	1058
AAA CGT TTT TCG TAC TTT AGC CGT GTT GCA CTG GAA TTG CTT TAC CAA Lys Arg Phe Ser Tyr Phe Ser Arg Val Ala Leu Glu Leu Leu Tyr Gln 355 360 365	1106
TCT GGG AAG AAA GTT GAC ATA ATT CAC TGC CAT GAC TGG CAG ACT GCA Ser Gly Lys Lys Val Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Gln Thr Ala 370 375 380	1154
TTT GTT GCA CCT CTT TAC TGG GAT GTA TAT GCA AAC CTG GGC TTC AAC Phe Val Ala Pro Leu Tyr Trp Asp Val Tyr Ala Asn Leu Gly Phe Asn 385 390 395	1202
TCA GCT AGA ATT TGT TTT ACC TGT CAC AAT TTT GAA TAT CAA GGA ATC Ser Ala Arg Ile Cys Phe Thr Cys His Asn Phe Glu Tyr Gln Gly Ile 400 405 410	1250
GCT CCA GCT CAG GAC TTA GCA TAT TGT GGT CTT GAT GTT GAT CAC CTG Ala Pro Ala Gln Asp Leu Ala Tyr Cys Gly Leu Asp Val Asp His Leu 415 420 425 430	1298
GAT AGA CCA GAC AGA ATG CGG GAT AAT TCA CAT GGC AGA ATA AAT GTT Asp Arg Pro Asp Arg Met Arg Asp Asn Ser His Gly Arg Ile Asn Val 435 440 445	1346

45

GTT AAG GGT GCA GTT GTA TAT TCC AAC ATT GTG ACA ACT GTA TCA CCA	1394
Val Lys Gly Ala Val Val Tyr Ser Asn Ile Val Thr Thr Val Ser Pro	
450 455 460	
ACA TAT GCA CAA GAG GTT CGC TCA GAG GGT GGG CGT GGG CTC CAA GAT	1442
Thr Tyr Ala Gln Glu Val Arg Ser Glu Gly Gly Arg Gly Leu Gln Asp	
465 470 475	
ACA CTC AAA GTG CAC TCC AAG AAA TTT GTT GGA ATA CTT AAT GGC ATT	1490
Thr Leu Lys Val His Ser Lys Lys Phe Val Gly Ile Leu Asn Gly Ile	
480 485 490	
GAC ACA GAT ACT TGG AAT CCG TCT ACG GAT AGG TTT CTC AAG GTT CAA	1538
Asp Thr Asp Thr Trp Asn Pro Ser Thr Asp Arg Phe Leu Lys Val Gln	
495 500 505 510	
TAC AGT GCT AAT GAT CTA TAT GGA AAG TCA GCA AAC AAA GCA GCT CTT	1586
Tyr Ser Ala Asn Asp Leu Tyr Gly Lys Ser Ala Asn Lys Ala Ala Leu	
515 520 525	
AGG AAG CAG TTG AAG CTT GCT TCC ACA CAA GCT TCT CAA CCA TTA GTT	1634
Arg Lys Gln Leu Lys Leu Ala Ser Thr Gln Ala Ser Gln Pro Leu Val	
530 535 540	
GGT TGC ATT ACG AGG CTA GTT CCT CAA AAG GGT GTA CAT CTC ATC AGG	1682
Gly Cys Ile Thr Arg Leu Val Pro Gln Lys Gly Val His Leu Ile Arg	
545 550 555	
CAT GCA ATA TAT AAA ATA ACT GAG TTG GGT GGT CAA TTT GTT CTG CTG	1730
His Ala Ile Tyr Lys Ile Thr Glu Leu Gly Gly Gln Phe Val Leu Leu	
560 565 570	
GGT TCA AGT CCA GTA CAG CAT ATC CAG AGA GAG TTC GAG GGT ATT GCG	1778
Gly Ser Ser Pro Val Gln His Ile Gln Arg Glu Phe Glu Gly Ile Ala	
575 580 585 590	
GAC CAA TTT CAG AAC AAC AAC AAT GTC AGG CTG CTT TTG AAG TAT GAT	1826
Asp Gln Phe Gln Asn Asn Asn Asn Val Arg Leu Leu Leu Lys Tyr Asp	
595 600 605	
GAT GCT CTG GCA CAT ATG ATC TTT GCA GCA TCA GAC ATG TTC ATT GTT	1874
Asp Ala Leu Ala His Met Ile Phe Ala Ala Ser Asp Met Phe Ile Val	
610 615 620	
CCT TCT ATG TTT GAA CCA TGT GGC CTC ACT CAG ATG GTA GCT ATG CGA	1922
Pro Ser Met Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Met Val Ala Met Arg	
625 630 635	
TAT GGT TCT GTG CCA GTT GTT CGG AGA ACC GGC GGT TTG AAT GAC AGT	1970
Tyr Gly Ser Val Pro Val Val Arg Arg Thr Gly Gly Leu Asn Asp Ser	
640 645 650	
GTC TTC GAT TTG GAC GAT GAA ACG ATA CCC ATG GAG GTG CGA AAT GGC	2018
Val Phe Asp Leu Asp Asp Glu Thr Ile Pro Met Glu Val Arg Asn Gly	
655 660 665 670	

46																
TTC	ACC	TTT	TTG	AAG	GCT	GAT	GAG	CAG	GAT	TTT	GGT	AAT	GCA	CTG	GAA	2066
Phe	Thr	Phe	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Gln	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	
				675					680					685		
AGA	GCT	TTC	AAC	TAC	TAC	CAC	AGA	AAA	CCT	GAA	GTT	TGG	AAA	CAG	TTG	2114
Arg	Ala	Phe	Asn	Tyr	Tyr	His	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	Trp	Lys	Gln	Leu	
				690					695					700		
GTG	CAG	AAA	GAC	ATG	AAG	ATA	GAT	TTC	AGC	TGG	GAT	ACT	TCA	GTT	TCT	2162
Val	Gln	Lys	Asp	Met	Lys	Ile	Asp	Phe	Ser	Trp	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	
				705					710					715		
CAA	TAC	GAA	GAA	ATC	TAT	CAG	AAA	ACA	GCC	ACT	CGA	GCC	AGG	GCA	GCG	2210
Gln	Tyr	Glu	Glu	Ile	Tyr	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	
				720					725					730		
GCA TAAACAGCAG AGACATTGAG ACAGTTCCT GCTGTCTCCA TGAAGTCTCC																2263
Ala																
735																
TAGATGCTGT GCTTAACCGT ATGGTAAAGA AATATGGTCT GTATCAGCTC AGAATTAAGC																2323
ATCTGCCGAG GAAGCGCGGT GCATCCGGAC TCGGGTGATAC AAGGGGCGAC GTGGCGTTAC																2383
GTGCAGTCCC CAACGAAGCA AAGAGACAGA AGTACAGCTG TACAGAACGG ATATCTTGTG																2443
AAGCACACAT TGGGATCAGG ACGTTTGGTG CTGCAGCTAC TTTCGGTGCA GAAGCACATA																2503
TATACGAGAC CTGCCAGGGC GAGCAAATAC CCAGTTATAC ACGCGATTGC TCAGCTCTAT																2563
CAAGCTGTGA ATTGAAAGAT TTCTATAGTG TATTCACGCG ACGTTTTTCAT AAAGTAGTGT																2623
GAGTTATGTA CTCTGACCAA AAAAAAAAAA																2652

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 735 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

His Glu Asn Phe Leu Lys Gly Lys Leu Ile Glu Ile Thr Glu Thr Glu
1 5 10 15

Glu Ser Leu Phe Lys Leu Glu Lys Glu Cys Ala Leu Leu Asn Ala Ser
20 25 30

Leu Arg Glu Leu Glu Cys Thr Ser Thr Ser Ala Gln Ser Asp Val Leu
35 40 45

Lys Leu Gly Pro Leu Gln Gln Asp Ala Trp Trp Glu Lys Val Glu Asn
50 55 60

Leu Glu Asp Leu Leu Asp Ser Thr Ala Asn Gln Val Glu His Ala Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Asp Gly Tyr Arg Asp Phe Gln Asp Lys Val Asp Lys Leu
 85 90 95
 Lys Ala Ser Leu Gly Thr Thr Asn Val Ser Glu Phe Cys Leu Tyr Leu
 100 105 110
 Val Asp Ile Leu Gln Gln Arg Val Lys Ser Val Glu Glu Arg Phe Gln
 115 120 125
 Ala Cys Asn His Glu Met His Ser Gln Ile Glu Leu Tyr Glu His Ser
 130 135 140
 Ile Val Glu Phe His Gly Thr Leu Ser Lys Leu Ile Asn Glu Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Lys Ser Met Glu His Tyr Ala Glu Gly Met Pro Ser Glu Phe Trp
 165 170 175
 Ser Arg Ile Ser Leu Leu Ile Asp Gly Trp Ser Leu Glu Lys Lys Ile
 180 185 190
 Ser Ile Asn Asp Ala Ser Met Leu Arg Glu Met Ala Trp Lys Arg Asp
 195 200 205
 Asn Arg Leu Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Met Glu Glu Arg
 210 215 220
 Glu Leu Ile Asp Ser Phe Leu Lys Met Ala Leu Pro Gly Thr Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Leu His Ile Val His Ile Ala Ala Glu Met Ala Pro Val Ala Lys
 245 250 255
 Val Gly Gly Leu Ala Asp Val Ile Ser Gly Leu Gly Lys Ala Leu Gln
 260 265 270
 Lys Lys Gly His Leu Val Glu Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Met
 275 280 285
 Gln His Asn Gln Ile Asn Asn Leu Lys Val Leu Asp Val Val Val Lys
 290 295 300
 Ser Tyr Phe Glu Gly Asn Met Phe Ala Asn Lys Ile Trp Thr Gly Thr
 305 310 315 320
 Val Glu Gly Leu Pro Val Tyr Phe Ile Glu Pro Gln His Pro Gly Lys
 325 330 335
 Phe Phe Trp Arg Ala Gln Tyr Tyr Gly Glu His Asp Asp Phe Lys Arg
 340 345 350
 Phe Ser Tyr Phe Ser Arg Val Ala Leu Glu Leu Leu Tyr Gln Ser Gly
 355 360 365

Lys Lys Val Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Gln Thr Ala Phe Val
 370 375 380
 Ala Pro Leu Tyr Trp Asp Val Tyr Ala Asn Leu Gly Phe Asn Ser Ala
 385 390 395 400
 Arg Ile Cys Phe Thr Cys His Asn Phe Glu Tyr Gln Gly Ile Ala Pro
 405 410 415
 Ala Gln Asp Leu Ala Tyr Cys Gly Leu Asp Val Asp His Leu Asp Arg
 420 425 430
 Pro Asp Arg Met Arg Asp Asn Ser His Gly Arg Ile Asn Val Val Lys
 435 440 445
 Gly Ala Val Val Tyr Ser Asn Ile Val Thr Thr Val Ser Pro Thr Tyr
 450 455 460
 Ala Gln Glu Val Arg Ser Glu Gly Gly Arg Gly Leu Gln Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Val His Ser Lys Lys Phe Val Gly Ile Leu Asn Gly Ile Asp Thr
 485 490 495
 Asp Thr Trp Asn Pro Ser Thr Asp Arg Phe Leu Lys Val Gln Tyr Ser
 500 505 510
 Ala Asn Asp Leu Tyr Gly Lys Ser Ala Asn Lys Ala Ala Leu Arg Lys
 515 520 525
 Gln Leu Lys Leu Ala Ser Thr Gln Ala Ser Gln Pro Leu Val Gly Cys
 530 535 540
 Ile Thr Arg Leu Val Pro Gln Lys Gly Val His Leu Ile Arg His Ala
 545 550 555 560
 Ile Tyr Lys Ile Thr Glu Leu Gly Gly Gln Phe Val Leu Leu Gly Ser
 565 570 575
 Ser Pro Val Gln His Ile Gln Arg Glu Phe Glu Gly Ile Ala Asp Gln
 580 585 590
 Phe Gln Asn Asn Asn Asn Val Arg Leu Leu Leu Lys Tyr Asp Asp Ala
 595 600 605
 Leu Ala His Met Ile Phe Ala Ala Ser Asp Met Phe Ile Val Pro Ser
 610 615 620
 Met Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Met Val Ala Met Arg Tyr Gly
 625 630 635 640
 Ser Val Pro Val Val Arg Arg Thr Gly Gly Leu Asn Asp Ser Val Phe
 645 650 655
 Asp Leu Asp Asp Glu Thr Ile Pro Met Glu Val Arg Asn Gly Phe Thr
 660 665 670

Phe Leu Lys Ala Asp Glu Gln Asp Phe Gly Asn Ala Leu Glu Arg Ala
675 680 685

Phe Asn Tyr Tyr His Arg Lys Pro Glu Val Trp Lys Gln Leu Val Gln
690 695 700

Lys Asp Met Lys Ile Asp Phe Ser Trp Asp Thr Ser Val Ser Gln Tyr
705 710 715 720

Glu Glu Ile Tyr Gln Lys Thr Ala Thr Arg Ala Arg Ala Ala Ala
725 730 735

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül codierend ein Protein mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt;
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz; und
 - (c) Nucleinsäuremolekülen, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren und ein Protein mit Stärkesynthase-Aktivität codieren;sowie der komplementäre Strang eines solchen Nucleinsäuremoleküls.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.
5. Oligonucleotid, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.
6. Vektor enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
7. Vektor nach Anspruch 6, wobei das DNA-Molekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

8. Wirtszellen, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 transformiert und genetisch modifiziert ist.
9. Protein codiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 9, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 8 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
11. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach Anspruch 6 oder 7 transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle abstammt, wobei das Nucleinsäuremolekül, das das Protein mit der biologischen Aktivität einer Stärkesynthase codiert, unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die die Transkription einer translatierbaren mRNA in pflanzlichen Zellen erlauben.
12. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
13. Pflanze nach Anspruch 12, die eine Nutzpflanze ist.
14. Pflanze nach Anspruch 13, die eine stärkepeichernde Pflanze ist.
15. Pflanze nach Anspruch 14, die eine Maispflanze ist.
16. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 12 bis 15 enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 11.
17. Stärke erhältlich aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 12 bis 15.

18. Transgene Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser Pflanzenzelle die Aktivität eines Proteins nach Anspruch 9 verringert ist aufgrund der Expression eines heterologen rekombinanten DNA-Moleküls, das
- (a) eine antisense-RNA codiert zu Transkripten von endogen in der Zelle vorliegenden Genen, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren; und/oder
 - (b) ein Ribozym codiert, das spezifisch Transkripte spaltet von endogen in der Zelle vorliegenden Genen, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren; und/oder
 - (c) eine RNA, die aufgrund eines Cosuppressionseffekts in den Zellen die Synthese eines erfindungsgemäßen Proteins inhibiert.
19. Pflanzenzelle nach Anspruch 18, wobei die Reduktion der Aktivität in dieser Zelle durch die Expression einer antisense-RNA zu Transkripten eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 erreicht wird.
20. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 18 oder 19.
21. Pflanze nach Anspruch 20, die eine Nutzpflanze ist.
22. Pflanze nach Anspruch 21, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.
23. Pflanze nach Anspruch 22, die eine Maispflanze ist.
24. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 20 bis 23, enthaltend Zellen nach Anspruch 18 oder 19.
25. Stärke erhältlich aus Pflanzen nach einem der Ansprüche 20 bis 24.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat. Application No.
PCT/EP 97/00158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 C12N5/10 C08B30/00
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C08B A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 103, no. 2, 1 October 1993, pages 565-573, XP000565731 TADASHI BABA ET AL: "IDENTIFICATION, CDNA CLONING, AND GENE EXPRESSION OF SOLUBLE STARCH SYNTHASE IN RICE (ORYZA SATIVA L.) IMMATURE SEEDS" cited in the application see page 570	1-9
X A	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994 * siehe das ganze Dokument, bes. Ex. 4, Zeilen 19-29 *	17,25 1-16, 18-24
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 1997

Date of mailing of the international search report

03.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 97/00158

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 2, 1994, pages 151-159, XP002031374 MU C. ET AL.: "Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm" cited in the application see the whole document ---</p>	1-25
A	<p>THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 2, August 1995, pages 283-294, XP002031375 EDWARDS A. ET AL.: "Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers" cited in the application see the whole document ---</p>	1-25
A	<p>PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, vol. 17, 1994, pages 601-613, XP002005943 MÜLLER-RÖBER B. AND KOSSMANN J.: "Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants" see the whole document -----</p>	1-25

Information on patient family members

PCT/EP 97/00158

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 97/00158

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 C12N5/10 C08B30/00
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C08B A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 103, Nr. 2, 1. Oktober 1993, Seiten 565-573, XP000565731 TADASHI BABA ET AL: "IDENTIFICATION, CDNA CLONING, AND GENE EXPRESSION OF SOLUBLE STARCH SYNTHASE IN RICE (ORYZA SATIVA L.) IMMATURE SEEDS" in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 570	1-9
X A	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28. April 1994 * siehe das ganze Dokument, bes. Ex. 4, Zeilen 19-29 *	17,25 1-16, 18-24

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Mai 1997

Abenddatum des internationalen Recherchenberichts

03.06.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inventar. natur. Aktenzeichen
PCT/EP 97/00158

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>THE PLANT JOURNAL, Bd. 6, Nr. 2, 1994, Seiten 151-159, XP002031374 MU C. ET AL.: "Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p>	1-25
A	<p>THE PLANT JOURNAL, Bd. 8, Nr. 2, August 1995, Seiten 283-294, XP002031375 EDWARDS A. ET AL.: "Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p>	1-25
A	<p>PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, Bd. 17, 1994, Seiten 601-613, XP002005943 MÜLLER-RÖBER B. AND KOSSMANN J.: "Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants" siehe das ganze Dokument -----</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter nales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00158

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9409144 A	28-04-94	AU 2696492 A EP 0664835 A	09-05-94 02-08-95
